

SÉRIE A. N° 672

N° D'ORDRE

1421

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. LE D^r P. PORTIER

DIRECTEUR-ADJOINT DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DE LA SORBONNE (HAUTES ÉTUDES).
PROFESSEUR A L'INSTITUT OCÉANOGRAPHIQUE.

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES SUR LES CHAMPIGNONS
ENTOMOPHYTES.

2^{me} THÈSE. — RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES SUR LES INSECTES
AQUATIQUES.

Soutenues le *9 juin*, devant la Commission d'examen

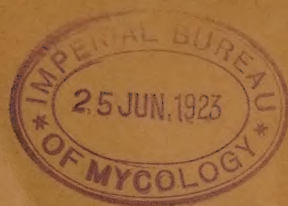
MM. G. BONNIER :	<i>Président.</i>
A. DASTRE	} <i>Examineurs.</i>
HAUG.	

FONTENAY-AUX-ROSES

LOUIS BELLENAND, IMPRIMEUR

14-16, ROUTE DE BIÈVRES, 14-16

1911



THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. LE D^r P. PORTIER

DIRECTEUR-ADJOINT DU LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DE LA SORBONNE (HAUTES ÉTUDES).
PROFESSEUR A L'INSTITUT OcéANOGRAPHIQUE.

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES SUR LES CHAMPIGNONS
ENTOMOPHYTES.

2^{me} THÈSE. — RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES SUR LES INSECTES
AQUATIQUES.

Soutenues le *6 juin*, devant la Commission d'examen

MM. G. BONNIER :	<i>Président.</i>
A. DASTRE	} <i>Examineurs.</i>
HAUG.	

FONTENAY-AUX-ROSES

LOUIS BELLENAND, IMPRIMEUR

14-16, ROUTE DE BIÈVRES, 14-16

1911

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MIL.

<i>Doyen</i>	P. APPELL, <i>Professeur</i>	Mécanique rationnelle.
<i>Doyen honoraire</i>	G. DARBOUX, —	Géométrie supérieure.
<i>Professeurs honoraires</i>	L. TROOST.	
	CH. WOLF.	
	J. RIBAN.	
<i>Professeurs</i>	LIPPMANN	Physique.
	BOUY	Physique.
	BOUSSINESQ	Physique mathémat. et calcul des probabilités.
	PICARD	Analyse supérieure et algèbre supérieure.
	H. POINCARÉ	Astronomie mathématique et mécanique céleste.
	Y. DELAGE	Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
	G. BONNIER	Botanique.
	DASTRE	Physiologie.
	KENIGS	Mécanique physique et expérimentale.
	VÉLAIN	Géographie physique.
	GOURSAT	Calcul différentiel et calcul intégral.
	CHATIN	Histologie.
	HALLER	Chimie organique.
	JOANNIS	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	JANET	Physique.
	WALLERANT	Minéralogie.
	ANDOYER	Astronomie physique.
	PAINLEVÉ	Mathématiques générales.
	HAUG	Géologie.
	HOUSSAY	Zoologie.
	H. LE CHATELIER	Chimie.
	GABRIEL BERTRAND	Chimie biologique.
	Mme P. CURIE	Physique générale.
	CAULLERY	Zoologie, Evolution des êtres organisés.
	C. CHABRIÉ	Chimie appliquée.
	G. URBAIN	Chimie.
	BOREL	Théorie des fonctions.
	MARCHIS	Aviation.
	Jean PERRIN	Physique.
	G. PRUVOT	Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
<i>Professeurs-adjoints</i>	N	Application de l'analyse à la géométrie.
	N	Calcul différentiel et calcul intégral.
	PUISEUX	Mécanique et astronomie.
	LEDUC	Physique.
	MATRUCHOT	Botanique.
	MICHEL	Minéralogie.
	HÉROUARD	Zoologie.
	Léon BERTRAND	Géologie.
	Rémy PERRIER	Zoologie (Enseignement P. C. N.).
	MOLLIARD	Physiologie végétale.
<i>Secrétaire</i>	COTTON	Physique.
	D. TOMBECK.	

A MES MAÎTRES

M. A. DASTRE

Membre de l'Institut, Professeur à la Sorbonne.

M. G. BONNIER

Membre de l'Institut, Professeur à la Sorbonne.

Hommage de sincère attachement et profonde
reconnaissance.

RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES

SUR LES

CHAMPIGNONS ENTOMOPHYTES

PAR

P. PORTIER

Directeur-adjoint du Laboratoire de Physiologie de la Faculté des Sciences,
Professeur à l'Institut Océanographique.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	2
PLAN DU TRAVAIL.....	5
CHAPITRE PREMIER. — Etude de la chenille.....	6
1° Origine des recherches entreprises.....	6
Des moyens qui permettent de se procurer des <i>Isaria</i> .	
2° La <i>Nonagria Typhæ</i> et ses microorganismes symbiotiques. — Généralités	10
3° Etude des déjections de la chenille.....	11
4° Etude des parois intestinales de la chenille.....	14
a) Intestin moyen.....	14
b) Intestin postérieur.....	16
5° Etude des autres tissus de la chenille.....	17
6° Etude du sang de la chenille.....	17
a) Examen du sang en chambre humide.....	18
b) Sort des leucocytes après la phagocytose.....	20
c) Etude microscopique du sang mélangé au chlorure de sodium à 6 pour 1000.....	20
d) Culture du sang.....	22
e) Etude de la chenille au moment de la métamorphose.....	23
CHAPITRE II. — Etude de la Chrysalide.....	24
a) Examen microscopique.....	25
b) Culture des microorganismes.....	25
CHAPITRE III. — Etude de l'Insecte parfait.....	29
a) Examen microscopique des divers organes.....	29
b) Culture des tissus de l' <i>imago</i>	31
c) Développement spontané de la Mucédinée dans les tissus du papillon après sa mort.....	31
d) Culture des déjections de la chenille.....	32
CHAPITRE IV. — <i>Résumé. Conclusions.</i>	
1° Résumé des notions acquises.....	33
2° Caractère de généralité des phénomènes observés.....	34
3° Rapport des <i>Isaria</i> et des insectes. Conception ancienne et conception nouvelle.....	36
4° Conclusions générales.....	40
APPENDICE.....	42
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.....	46

INTRODUCTION

La digestion des animaux herbivores présente encore bien des points obscurs. Au nom de la logique, ils ont besoin d'un ferment capable de solubiliser la cellulose; mais la Nature n'a cure de notre logique boiteuse, et, jusqu'à présent, toutes les recherches tendant à isoler une « *cytase* » de la muqueuse digestive des ruminants ont complètement échoué.

Les personnes étrangères à la physiologie nous reprochent d'expérimenter trop souvent sur les mêmes animaux. Elles ont tort à certains égards; les Vertébrés supérieurs sont pour nous des ateliers où la division du travail est poussée au summum de perfection, où chaque ouvrier (j'entends chaque élément anatomique), accomplit une besogne bien définie, et, partant, relativement simple, bien que trop compliquée encore, pour nos faibles moyens.

Elles ont raison aussi, en ce sens que l'étude de la physiologie comparée nous offre toujours des horizons nouveaux; l'essence intime du phénomène reste partout la même, mais le mécanisme souvent obscur et caché se dévoile parfois tout à coup dans un groupe zoologique éloigné.

Les insectes sont, parmi les invertébrés des êtres exceptionnellement intéressants par leur souplesse à s'adapter aux circonstances, par leur malléabilité physiologique et par l'audace avec laquelle ils savent résoudre les questions les plus complexes.

Il y a parmi eux des larves xylophages qui vivent, croissent et arrivent au terme de leur développement en mangeant uniquement des substances ligneuses, c'est-à-dire en se contentant d'un régime qui amène une mort rapide chez les Mammifères qui semblent bien adaptés à la digestion de la cellulose (1).

(1) Des souris nourries à la sciure de bois meurent en trois jours environ, ainsi que j'ai eu l'occasion de le constater récemment à plusieurs reprises.

Pourquoi ne point utiliser ces animaux si bien doués pour obtenir la solution du problème posé ?

C'est ce que j'ai fait, et bien m'en a pris. Ici le mécanisme fonctionne à découvert, il est d'une simplicité, d'une ingéniosité et d'une efficacité admirables. L'insecte a domestiqué deux microorganismes : une bactérie, un champignon. La bactérie sécrète une cytase qui solubilise la cellulose. Le champignon se nourrit des matières qui lui sont ainsi offertes, puis il pénètre dans le milieu intérieur de la larve où il est dévoré et incorporé par les tissus. C'est une nutrition à deux étages : semblable, à tout prendre, à celle que l'on rencontre dans la nature, mais ici, la récolte des graines nutritives se fait dans la lumière même de l'intestin. C'est un circulus à rayon raccourci.

Chaque insecte a domestiqué son champignon. Il y tient tant qu'il le transmet à sa postérité dans l'œuf. Et, fait bien inattendu, ce champignon est un *Isaria*. Ces *Isaria* auxquels on avait fait une si fâcheuse réputation !

La méritent-ils ? Oui et non. Ce sont des serviteurs, zélés, mais bien entreprenants. Leur possesseur les doit maintenir sous son joug d'une main ferme ; sinon, ils le dévorent ; dans tous les cas, son cadavre devient leur proie.

Quelles surprises nous réserve l'étude biochimique de ces champignons ? Pour qui saura chercher, la récolte sera sans doute abondante, si on se rappelle la riche moisson de faits de premier ordre obtenue par M. Gabriel Bertrand avec une bactérie dont un insecte lui a fait présent (1).

J'étais parti en campagne pour faire de la physiologie animale et voici qu'un peu de mycologie se mêle à ma récolte. Mon maître en botanique, M. Bonnier a l'indulgence de le remarquer ; il voit qu'il s'agit aussi des insectes sur lesquels il a publié tant de beaux travaux ; le voici tout disposé à l'indulgence et il veut bien admettre ces modestes recherches comme seconde thèse. Je lui en exprime ma sincère gratitude.

Qu'il me soit permis aussi d'offrir mes cordiaux remerciements à mon excellent ami M. Radais, professeur à l'Ecole

(1) Etude biochimique de la bactérie du Sorbose. (Paris, Gauthier-Villars, 1901).

supérieure de Pharmacie qui a souvent guidé mes pas chancelants sur le terrain un peu nouveau pour moi sur lequel croissent les Mucédinées.

J'exprime ici toute ma reconnaissance à M. Henri du Buysson, mon savant collègue de la Société entomologique, qui, avec une inlassable complaisance m'a fourni de nombreuses et très intéressantes larves d'insectes xylophages; à M. Wery, sous-directeur de l'Institut national agronomique qui a bien voulu me procurer de nombreuses larves qui m'ont été fort utiles au cours de ces recherches.

Merci aussi à M. Sartory, préparateur à l'Ecole supérieure de Pharmacie, à l'aide duquel je dois la séparation de l'*Isaria* et de sa bactérie commensale.

Merci enfin à mon si dévoué préparateur et ami, M. Cassas, auquel je dois les dessins qui ornent ce travail.

PLAN DU TRAVAIL

Ce travail est l'exposé des principaux résultats de recherches entreprises depuis plus de deux ans, mais que je n'ai pu conduire avec continuité en raison d'autres travaux qu'il me fallait poursuivre parallèlement.

On verra que j'arrive à une conception du rôle des *Isaria* qui est extrêmement éloignée de celle qui avait cours jusqu'ici.

Ceux-ci forment une union symbiotique avec certaines chenilles xylophages à la nutrition desquelles ils contribuent puissamment. Cette symbiose est héréditaire, car elle se transmet par l'œuf.

Cet envahissement du milieu intérieur des insectes par des microorganismes n'est pas un fait unique, ni même exceptionnel à mon avis. Avec des différences d'intensité très grandes, on va le retrouver probablement partout où on saura le mettre en évidence.

Ce n'est point non plus un fait tout à fait nouveau. Tour à tour affirmé, puis nié par des auteurs d'égale valeur, il présente, à mon avis, une importance doctrinale considérable.

Aussi, dans un Appendice, j'ai réuni les principaux faits connus sur la question, afin d'en tirer quelques vues générales.

Qu'on ne s'attende pas à trouver ici la bibliographie complète du sujet. Je compte reprendre prochainement l'exposé de cette question sous une forme plus étendue.

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE DE LA CHENILLE

1^o Origine de ces recherches

En quelques mots, je vais d'abord exposer par suite de quelles circonstances, j'ai entrepris ces recherches.

De nombreuses expériences faites sur les insectes des divers ordres m'avaient enseigné qu'un liquide pour pénétrer par l'ouverture des stigmates et envahir les trachées des animaux doit posséder certaines qualités physiques, et notamment une faible tension superficielle.

Une application pratique découlait tout naturellement de ces notions nouvellement acquises. Il y avait là un procédé certain de destruction des insectes. Ceux-ci protégés par la cuirasse chitineuse de leur exosquelette peuvent supporter impunément le contact de liqueurs toxiques qui, n'étant nullement absorbées, ne peuvent exercer leur action néfaste sur les éléments anatomiques. Ces mêmes liquides envahissant les trachées sont très rapidement absorbés et amènent la mort rapide de l'insecte.

C'est un phénomène analogue à celui qu'on observe chez les Mammifères lorsqu'on dépose quelques gouttes d'une solution d'un alcaloïde, comme la strychnine, sur la peau ou qu'on l'injecte par la trachée à l'intérieur du poulmon.

En ce qui concerne les insectes endo-parasites ou leurs larves, le problème se compliquait par la nécessité de trouver une substance toxique pour l'insecte, mais inoffensive pour l'hôte parasité. J'ai montré dans un autre travail que l'essence de moutarde répond assez bien à ces deux *desiderata*.

Cependant une solution plus élégante s'est présentée à mon esprit. Elle consiste à incorporer des spores d'un champignon entomophyte à un liquide inoffensif par lui-même, mais possédant les qualités physiques énoncées ; ces spores ayant pénétré dans les trachées germeront, envahiront les tissus de l'insecte et causeront sa mort rapide. Il est probable même que la maladie pourra se propager aux insectes voisins d'où un nouvel et considérable avantage du procédé préconisé.

On sait que toutes les recherches récentes tendent chaque jour davantage à attribuer un rôle prépondérant aux insectes dans la propagation des maladies infectieuses, on conçoit donc tout l'intérêt qui s'attache à trouver une solution satisfaisante du problème proposé.

Parmi les champignons entomophytes qui pouvaient être utilisés dans le cas présent, les *Isaria* se sont présentés à mon souvenir. Je le dois certainement pour beaucoup à la lecture du beau mémoire de GIARD (1893). On verra que mes recherches m'éloignent, à certains égards, considérablement de la conception physiologique du rôle des *Isaria* tel que le comprenait cet éminent naturaliste, mais, si la première étape n'eût pas été franchie grâce à ses travaux, il est bien probable que je n'eus pas été capable de mener à bien le petit travail que je présente aujourd'hui.

Des moyens qui permettent de se procurer des Isaria. — Pour se procurer ces Mucédinées parasites des insectes, on peut profiter d'un hasard heureux. On trouve, en effet, assez fréquemment dans la nature des larves ou des chrysalides momifiées par le développement du champignon.

J'ai été amené, par les considérations suivantes à présumer qu'il existait un autre moyen plus commode, et surtout moins aléatoire de se procurer ces champignons.

Comme il arrive fréquemment, mon goût pour la biologie, s'est manifesté tout d'abord par la récolte des insectes. L'étude des papillons, l'éducation de leurs larves, a occupé la plus grande partie des loisirs de mes jeunes années. Or, dès ce temps déjà lointain, j'avais été vivement frappé par le phénomène suivant :

Certains papillons tels que les *Sésies*, les *Cossus*, les *Zeuzères* et aussi certains Microlépidoptères ont, en collection, une déplorable habitude qui fait le désespoir du collectionneur, c'est celle de « tourner au gras ».

Voici un papillon qui a été obtenu d'éclosion. Après avoir été mis à mort et soigneusement étalé, il est piqué dans la boîte de collection où il brille au milieu de ses congénères par la fraîcheur impeccable de sa parure.

Au bout de quelques semaines, le jeune entomologiste constate avec douleur que l'éclat de sa précieuse capture commence à s'affaiblir; les ailes et l'abdomen prennent un aspect plus mat. Rapidement le mal va en s'accroissant, les couleurs de l'insecte se ternissent et bientôt il est transformé au point qu'on croirait qu'il a été trempé dans l'huile. Comme disent les entomologistes : « l'insecte a tourné au gras ».

Une étude attentive révèle d'autres signes moins apparents. L'examen de l'abdomen pratiqué à la loupe permet d'apercevoir des sortes de cristallisations.

Si l'insecte n'est pas placé dans un endroit parfaitement sec, on voit son corps et ses antennes se couvrir de « moisissures ». Si on le place dans une atmosphère saturée d'humidité (ramollissoir), celles-ci prennent un développement subit et, parfois, en quelques heures, le papillon est recouvert d'un épais feutrage d'hyphes qui paraissent bien provenir des organes internes et être sortis par les points où la cuticule chitineuse se montre plus mince.

Si on vient à sectionner l'abdomen de l'insecte, on le trouve rempli d'un tissu qui laisse une tache grasse sur le papier. Si on emploie du papier de tournesol, on constate que ce liquide gras possède une réaction *très nettement acide*.

Cette acidité très accentuée, je le répète, peut encore se manifester d'une autre manière. Si le papillon a été piqué avec une épingle non recouverte d'un vernis isolant, elle est attaquée par l'acide et un sel de cuivre d'une belle couleur verte se remarque au point où l'épingle a perforé la chitine. Il arrive même que l'attaque de l'épingle soit si marquée que le sel de cuivre vienne foisonner à l'endroit indiqué. Parfois même, bien que rarement, l'épingle est sectionnée.

On peut, tant bien que mal, « dégraisser » le papillon par des moyens tels que le séjour dans la terre de Sommières, mais, outre qu'il ne reprend jamais complètement son éclat primitif, le « tournage au gras » l'envahit presque toujours de nouveau.

Chez les Coléoptères, on ne remarque guère le même phénomène, mais, cela tient sans doute, à ce que les étuis cornés des élytres recouvrent l'abdomen et sont formés d'une épaisse chitine qui ne change guère d'aspect même lorsqu'on la badigeonne d'huile.

Cependant, ici encore, on retrouve les sels de cuivre verts au contact de l'épingle non vernie et le phénomène est beaucoup plus marqué pour certaines familles (Longicornes, Donacies, certains Charançons, etc.).

Si maintenant, on jette un coup d'œil d'ensemble sur les insectes qui présentent au maximum le phénomène décrit, on constate ce fait bien remarquable que tous possèdent des larves vivant, non pas de feuilles, mais aux dépens du bois, des *larves xylophages*. Et le fait est vrai, aussi bien pour les Coléoptères, que pour les Papillons (1).

Il m'a semblé que plusieurs des symptômes précédemment énoncés rappelaient ceux que l'on observe dans la Muscardine des vers à soie. Ici comme là, on constate que les humeurs de l'insecte deviennent acides ; dans la Muscardine aussi il existe des amas de cristaux qu'on a rapportés à un oxalate ; enfin, dans cette affection, l'insecte placé dans des conditions convenables se couvre d'une moisissure blanche qu'on sait être constituée par les fructifications du *Botrytis Bassiana*, qui est, comme on le sait, une forme d'*Isaria*.

Quelque paradoxale que semble au premier abord cette idée, j'ai donc été amené à me demander si les insectes précédemment énumérés n'étaient pas atteints d'une sorte de *muscardine physiologique*.

Tel est le point de départ de mes recherches. On verra que l'hypothèse s'est trouvé complètement vérifiée et que j'ai été amené à constater des faits bien inattendus en poursuivant l'étude des insectes xylophages et de leurs larves.

(1) Nous nous bornons pour l'instant à envisager seulement ces deux ordres d'insectes.

2° La *Nonagria typhæ* et ses microorganismes symbiotiques. Généralités

Les *Nonagria* sont des Lépidoptères hétérocères appartenant au groupe des Noctuelles.

Les insectes parfaits de couleur jaune ou grisâtre se rencontrent rarement dans la nature. Il est au contraire facile de se procurer leurs chenilles qui vivent toutes à l'intérieur des tiges de plantes aquatiques dont elles dévorent la moelle.

Une des espèces les plus abondantes est la *N. typhæ* dont la chenille dévore l'intérieur des tiges du *Typha latifolia* (et quelquefois, mais bien plus rarement, celles du *T. angustifolia*).

C'est une larve dont la longueur est très considérable par rapport à la largeur, curieux exemple d'adaptation, étant donné son habitat.

Avec un peu d'habitude, on reconnaît en place et du premier coup d'œil les tiges parasitées. Elles ont été, en effet, entravées dans leur croissance et les feuilles supérieures ont souvent une teinte jaunâtre.

En examinant la tige du *Typha* habité, on ne tarde pas à découvrir au voisinage du niveau de l'eau et quelquefois au dessous, dans le cas de crue récente, un trou ordinairement obstrué par des déjections réunies par des fils de soie. C'est par là que la larve a pénétré à l'intérieur de la tige.

En fendant celle-ci, on trouve qu'elle a été creusée suivant l'axe. Le canal central ainsi formé contient des amas étagés de déjections. Au-dessus de l'amas supérieur, on trouve la chenille entourée d'un liquide visqueux qui émane des parois du tunnel qu'elle est en train de se creuser.

Il est à remarquer qu'une même tige ne renferme jamais qu'une seule chenille. Ceci n'a pas lieu de surprendre les personnes qui ont pratiqué l'élevage de ces larves. Elles savent que celles-ci sont très carnassières ; si, par mégarde, on en met deux dans une même boîte, la plus forte dévore immédiatement la plus faible.

Remarquons que cette habitude est avantageuse à l'es-

pèce. Quand la chenille est renfermée à l'intérieur d'une tige et que le trou d'entrée se trouve au-dessous de la surface de l'eau, elle est dans une véritable cloche à plongeur. Si on venait à percer dans la tige un trou au-dessus d'elle, l'eau monterait immédiatement par le trou inférieur et remplissant le canal central, submergerait la larve.

Quand une de celles-ci a épuisé la nourriture contenue dans une tige et qu'elle en cherche une nouvelle à explorer, elle est sans doute avertie par quelque signe lorsqu'une tige est habitée par une de ses congénères et elle se garde d'y pénétrer de crainte d'être dévorée.

3^e Etude des déjections de la chenille

Fendons une tige de *Typha* et extrayons la chenille qu'elle contient. En pressant un peu celle-ci entre les mors d'une pince flexible, nous provoquons facilement l'expulsion par l'anus de déjections qui sont reçues sur une lame propre et passée à la flamme.

Délayons une parcelle de ces déjections dans du chlorure de sodium à 6 pour 1000 et couvrons d'une lamelle.

Nous constatons par l'examen d'un fort objectif à sec ou mieux d'un objectif à immersion que les matières expulsées par la chenille sont constituées par des débris de moelle de *Typha* dont tout l'intestin est d'ailleurs bourré ainsi qu'il est facile de s'en assurer.

Au milieu de ces débris existent de nombreux micro-organismes.

Les plus apparents sont des sortes de grosses bactéries fusiformes souvent réunies deux à deux et alors dans le prolongement l'une de l'autre (*b*, fig. 1).

Les extrémités de ces microorganismes paraissent plus réfringentes que le milieu. La plupart d'entre eux sont fixés sur les débris ligneux qui encombrant la préparation. Quel-



Fig. 1. — Examen microscopique des déjections de la chenille de *Nonagrion typha*.
a, Conidie ovale ordinaire ; b, Deux conidies accolées en prolongement ; c, conidie géante.

ques autres sont libres. Si la température est suffisamment élevée (25°), on voit alors très nettement qu'ils se meuvent lentement. Leur allure rappelle celle des diatomées.

Un autre caractère est très frappant. C'est l'énorme différence de taille qui existe entre ces divers microorganismes.

La plupart d'entre eux présente une longueur voisine de 7 μ ; mais d'autres (c, fig. 1) atteignent une taille géante, ils mesurent jusqu'à 35 μ (1). On trouve d'ailleurs toutes les grandeurs intermédiaires entre ces deux extrêmes.

Ce fait nous donne déjà à penser que nous n'avons pas affaire à une véritable bactérie, mais bien aux *conidies* d'un champignon.

C'est en effet ce que les études qui suivent vont nous prouver.

Enfin, nous apercevons encore çà et là des cristaux aciculaires rappelant comme forme les cristaux d'acides gras, mais ils n'en possèdent pas toutes les réactions.

Une dernière remarque. Quand on oblige une de ces chenilles à expulser ses déjections sous la surface de l'eau, on voit s'échapper de celles-ci, au moment où elles arrivent dans le liquide de nombreuses petites bulles de gaz.

Abandonnons l'observation de ces déjections à l'état frais, et essayons d'obtenir une préparation colorée en utilisant la technique habituelle.

Nous frottons une déjection sur une lame, ou nous laissons sécher à une chaleur douce la préparation obtenue par délayage de la déjection. Nous fixons par le mélange : alcool absolu-éther et nous colorons par le bleu de méthylène, par le violet de gentiane, ou par la thionine, puis nous montons au baume après dessiccation. Nous constatons que les microorganismes précédents ne se sont nullement colorés.

D'autres méthodes classiques nous donnent également un résultat négatif. Citons, par exemple, la méthode de Gram et les méthodes employées pour colorer les bacilles acido-résistants (Fuchsine phéniquée, etc.).

(1) J'ai même rencontré parmi ces micro-organismes des exemplaires qui atteignaient 49 μ ; par contre les plus petits descendent à 3 μ .

Cette résistance à la coloration est d'ailleurs, comme je m'en suis assuré, une propriété commune aux microorganismes qui peuplent le tube digestif des divers insectes et de leurs larves.

Je ne sais si le fait est connu, je ne l'ai vu signaler nulle part. Il me semble utile à connaître, car il peut être la cause d'erreurs graves dans les études bactériologiques poursuivies chez les insectes.

Je me hâte d'ajouter qu'il existe des moyens simples et d'une efficacité certaine pour arriver à colorer tous ces microorganismes qui semblent protégés par une capsule impénétrable aux réactifs précédemment cités. Je vais indiquer deux procédés.

Le premier, et celui dont l'emploi est le plus simple, est le mélange indiqué par Gueguen (1906). Il est composé d'acide lactique dans lequel on a fait dissoudre avec les précautions voulues du bleu Cotton, du Sudan III et de la teinture d'iode.

Le bleu Cotton colore le protoplasma, le Sudan les inclusions grassieuses ou les lipoides, la teinture d'iode le glycogène ou l'amidon. C'est un réactif très précieux. Il colore presque instantanément les microorganismes même sans fixation préalable.

On peut le simplifier en supprimant le Sudan qui a l'inconvénient de se séparer au bout de quelque temps sous forme de gouttelettes.

Le second consiste à fixer la préparation par le liquide de Bouin dans lequel il est préférable de la laisser séjourner plusieurs heures, puis de laver soigneusement à l'alcool à 95° et de colorer par la méthode de l'hématoxyline au fer de Heidenhain. On monte ensuite au baume.

Ces deux procédés se complètent (1) et fournissent des renseignements intéressants sur la structure des conidies, notamment des conidies géantes dont une étude détaillée au point de vue cytologique présenterait un véritable intérêt. Mais ce n'est pas le lieu d'insister ici sur ce sujet.

¹ (1) La méthode de Gueguen présente l'inconvénient de ne fournir que difficilement des préparations permanentes.

4^o Etude des parois intestinales de la chenille

Sur une jeune chenille, détachons l'intestin et étalons-le sur une lame porte-objet. Déjà, au simple examen dans le chlorure de sodium à 6 pour 1000, nous voyons que les cellules épithéliales de l'intestin contiennent de très nombreuses inclusions qui ressemblent bien aux conidies du contenu intestinal.

Faisons sécher à une chaleur douce un morceau d'intestin étalé et traitons-le par le réactif de Gueguen ; les inclusions cellulaires se coloreront aussitôt en bleu intense révélant ainsi leur nature végétale (1).

Il semble donc bien probable, d'après ces observations superficielles, que les conidies, sans doute en vertu de leur mobilité, pénètrent à l'intérieur des cellules épithéliales de l'intestin. Mais la méthode des coupes peut seule nous donner des résultats précis et certains sur la distribution des microorganismes à l'intérieur de la cellule.

Le procédé qui m'a donné les préparations les plus démonstratives consiste à fixer les tissus au liquide de Bouin pendant 24 heures, à laver ensuite à l'alcool à 95° (2) jusqu'à élimination aussi complète que possible de l'acide picrique.

Le tissu coupé dans la paraffine est coloré à l'hématoxyline ferrique. En décolorant à point sous le microscope par l'alun de fer, on obtient des préparations très démonstratives.

Il nous faut distinguer ce qui se passe dans l'intestin moyen (portion du tube digestif située en amont de l'embouchure des tubes de Malpighi), de l'intestin postérieur portion située en aval des mêmes tubes.

a) *Intestin moyen.* — Ici, les cellules épithéliales ne présentent aucun revêtement de chitine. Elles se terminent vers

(1) Le bleu Cotton dissous dans l'acide lactique constitue en effet un réactif très précieux pour déceler un organisme végétal même de très faible taille au milieu d'un tissu animal.

(2) Il est essentiel pour avoir des préparations démonstratives de ne pas laver les tissus à l'eau à la sortie du liquide de Bouin.

la lumière de l'intestin par des extrémités arrondies (fig. 2).

Ces longues cellules cylindriques présentent un noyau ovale *n* situé vers la base de la cellule.

Le protoplasma de la cellule contient de très nombreuses conidies qui ne sont pas réparties uniformément, mais qui existent çà et là sous forme d'amas et à des hauteurs variables de la cellule. On a l'impression que les conidies ont pénétré par « bouffées » pourrait-on dire par l'extrémité de la cellule tournée vers la lumière intestinale et qu'elles cheminent ensuite de conserve vers la base de la cellule.

On a, en somme, une

apparence très analogue à celle qui existe lors du phénomène de l'absorption des graisses, les conidies remplaçant ici les globules graisseux mis en évidence par un traitement à l'acide osmique.

Comme on le voit bien sur la figure 2 en *i*, les cellules épithéliales renferment encore des inclusions de forme très bizarre sur la nature desquelles, il m'a été impossible jusqu'ici de me faire une idée nette. Ce sont des formations allongées formées presque toujours d'une partie supérieure conique s'insérant par une sorte de pédicule sur une partie inférieure cylindrique qui va en s'atténuant vers le bas.

Toute la formation est teinte avec beaucoup d'intensité par l'hématoxyline ferrique bien que la préparation ait été décolorée à point par l'alun de fer puisque les noyaux ont leur chromatine seule colorée.



Fig. 2. — Coupe de l'intestin moyen de la chenille de *Nonagria typhae*, en pleine digestion.
c, conidies ; n, noyaux ; i, inclusions cellulaires de nature indéterminée ; m, muscles striés du tube digestif.

Peut-être sont-ce là des amas de conidies introduites depuis un certain temps à l'intérieur de la cellule et qui auraient subi *in situ* une sorte de digestion intra-cellulaire. Je ne donne bien entendu cette interprétation que sous toutes réserves. De nouvelles recherches sont nécessaires pour élucider la nature de ces singulières formations.

b) *Intestin postérieur*. — Ici la surface de la cellule en rapport avec la lumière de l'intestin possède un revêtement de chitine. Malgré cela, de nombreuses conidies existent encore dans le protoplasma de la cellule (c, fig. 3). Il semble



Fig. 3. — Coupe de l'intestin postérieur de la chenille de *Nonugria typhae* (BOVIN, Hématoxylin ferrique).

c, conidies; n, noyaux; m, muscles également envahis par les conidies.

donc qu'elles aient pénétré à travers le revêtement de chitine qui présente probablement des perforations.

Dans l'intestin moyen, toutes les conidies ont la même apparence (celle des conidies de la lumière de l'intestin);

ici ces microorganismes semblent revêtir deux formes : l'une *c* semblable à celle que nous connaissons, l'autre *c'* dont le centre seul se colore par l'hématoxyline ferrique. Peut-être sont-ce là d'autres microorganismes que nous allons retrouver en étudiant le sang.

5° Etude des autres tissus de la chenille

Les autres tissus de la chenille examinés par la même méthode se montrent presque tous infestés par les conidies.

Les muscles striés, en particulier ceux qui entourent le tube digestif contiennent en abondance ces microorganismes (*m*, fig. 2 et fig. 3).

Le tissu graisseux se montre particulièrement envahi. L'hypoderme des trachées en contient aussi, mais déjà moins. Les cellules épithéliales des tubes de Malpighi en contiennent aussi, mais d'une manière beaucoup plus discrète. La lumière des tubes de Malpighi ou des trachées ne contient jamais aucune conidie.

Les cellules mères des spermatozoïdes n'en contenaient pas sur la chenille mâle que j'ai examinée; l'enveloppe épithéliale de la glande en contenait au contraire beaucoup.

En raison de la lenteur du procédé et du travail qu'il impose, je n'ai examiné ainsi à fond que quelques exemplaires des chenilles de *Nonagria*. Toutes m'ont donné des résultats presque identiques.

Par la méthode rapide des dilacérations et examen avec le réactif de Gueguen, j'ai pu constater la présence constante des conidies dans les divers tissus de tous les exemplaires examinés d'environ 60 chenilles, toutes ayant l'apparence d'une excellente santé.

6° Etude du sang de la chenille

Après avoir constaté la présence des conidies dans l'épithélium du tube digestif, il vient immédiatement à l'esprit de voir si elles passent dans le sang, et d'étudier ce qu'elles y deviennent.

Mais il y a ici un écueil à éviter. On sait que chez beaucoup de larves d'insectes, et chez nos chenilles de Lépidoptères en particulier, le tube digestif, distendu par les matières alimentaires s'applique étroitement sur la partie interne des téguments, de sorte qu'en faisant une piqûre à ceux-ci pour prélever du sang, on risque toujours de blesser le tube digestif, d'où une cause de contamination du liquide sanguin par les microorganismes contenus dans la cavité ou les parois de l'intestin.

Afin de me mettre à l'abri de cette erreur, et aussi dans le but de prélever du sang aseptiquement pour en faire des cultures, voici, après bien des tâtonnements, le mode opératoire auquel je me suis arrêté définitivement.

La chenille est attachée sur une planchette mince de liège d'une part par le dernier anneau, et d'autre part par la tête au moyen de deux fils fixés à des épingles ; la larve est fortement étirée suivant sa longueur de manière à l'immobiliser. On s'arrange de manière que la tête et les premiers anneaux soient situés en face d'un trou dont la planchette est percée.

On lave alors à plusieurs reprises la partie antérieure de la chenille avec de l'eau oxygénée. On peut aussi entourer cette partie de l'animal d'un peu de papier Joseph imbibé d'eau oxygénée (1). Les premiers anneaux, et les pattes écailleuses qu'ils portent sont bientôt stérilisés ; on éloigne le papier Joseph et on lave avec un peu d'eau stérile. Il suffit alors pour avoir du sang de couper avec des ciseaux flambés une ou plusieurs des six pattes écailleuses. Le sang peut êtreensemencé dans un milieu de culture approprié ou être examiné en chambre humide.

a) *Examen du sang en chambre humide.* — Avec un grossissement de 500 à 600 diamètres, le sang examiné montre un grand nombre de leucocytes arrondis dont le protoplasma contient de nombreuses inclusions sur la signification desquelles nous allons revenir.

(1) Il n'est nullement à craindre que, pendant cette manœuvre, l'eau oxygénée pénètre par les stigmates de la larve. Je me suis assuré que cela était impossible.

On aperçoit en outre çà et là de nombreuses conidies ovales qu'on reconnaît facilement à leur forme, à leur protoplasma de teinte vert bleu, et au fait qu'elles se colorent vivement par le réactif de Gueguen.

Ces conidies m'ont paru moins mobiles dans le sang que dans les déjections intestinales.

Si on a soin d'opérer l'examen du sang à une température suffisamment élevée (1) à + 25° environ, on voit bientôt un leucocyte s'approcher lentement d'une des conidies vers laquelle il semble être attiré par un phénomène de chimiotaxie positive des plus manifestes. Il l'atteint bientôt (2). Il est 4 h. 35.

Des pseudopodes entourent peu à peu le microorganisme. A 5 heures, il est entièrement renfermé à l'intérieur du protoplasma du leucocyte, mais on le distingue encore nettement des autres inclusions sphérulaires à son apparence moins réfringente et à sa forme ovale.

5 h. 15, la conidie a perdu sa forme, c'est une sphérule moins réfringente que les voisines, mais de forme arrondie identique.

Le leucocyte présente encore une bosse dans la région de cette conidie.

5 h. 20 la bosse s'efface, il est maintenant tout à fait impossible de distinguer des sphérules voisines celle à laquelle la conidie a donné naissance.

Bien des fois, j'ai assisté à ce phénomène de la phagocytose des conidies du sang. Je pense qu'il n'y a pas le moindre doute à conserver que ce soit là un *phénomène normal*. Les conidies après avoir traversé l'épithélium intestinal arrivent dans le sang; là elles rencontrent les leucocytes et sont immédiatement phagocytées.

L'examen attentif des leucocytes montre que les inclusions dont leur protoplasma est bourré ne sont que des conidies à divers états de digestion.

Il est fort instructif, à ce point de vue, de fixer du sang

(1) C'est là une condition *absolument essentielle* pour observer le phénomène décrit.

(2) Je copie textuellement ici une des observations consignée sur mon cahier d'expériences. (Expérience du 18 août 1910.)

aux vapeurs d'acide osmique, puis de le dessécher à basse température et de le traiter par le réactif de Gueguen. On voit alors que la conidie qui vient d'être incorporée par le leucocyte et qui a encore conservé sa forme se colore en bleu par le bleu Cotton ; à mesure que sa transformation s'opère, elle prend une affinité de plus en plus grande pour le Sudan, colorant des graisses, de sorte qu'elle se colore d'abord en violet, puis en rouge vineux, enfin en rouge franc.

L'examen d'un nombre suffisant de leucocytes montre ainsi tous les intermédiaires entre la conidie typique et la sphérule graisseuse (ou lipoïde), résultat de la digestion phagocytaire.

b) *Sort des leucocytes après la phagocytose.* — Certains leucocytes sont, à tel point, bourrés de sphérules graisseuses qu'ils prennent un aspect mûriforme. Or, jamais en chambre humide, on ne voit de tels éléments s'approcher des conidies pour les phagocyter. On peut se demander quel est leur sort.

Il est difficile d'apporter, sur ce point, une solution certaine. Il me semble qu'il faut rapprocher ces faits de certaines dispositions bien spéciales présentées par le tissu graisseux des chenilles de *Nonagria*. On trouve, en effet, en certains points de cet organe de réserve de petites tablettes de forme cristalline qui paraissent bien provenir de la transformation *in situ* des leucocytes précédents qui auraient gagné le tissu adipeux et qui s'y seraient immobilisés. Là encore, une étude attentive, permet de saisir les intermédiaires de cette transformation.

c) *Etude microscopique du sang mélangé au chlorure de sodium à 6 pour 1000.* — Prélevons du sang de chenille de *Nonagria*, par la méthode précédemment décrite, et mélangeons ce sang à environ dix fois son volume de chlorure de sodium à 6 pour 1000 stérile ; abandonnons le mélange à la température de 25° environ.

Nous observerons les deux phénomènes suivants :

1° Le mélange de sang et de chlorure de sodium se colore rapidement en violet noir. Cette coloration est souvent

d'une *intensité extrême*. Il semble bien qu'on ait affaire à une réaction tyrosinasiq (1) ;

2° L'examen microscopique du même mélange pratiqué à intervalles réguliers montre qu'il s'y opère en même temps des transformations morphologiques importantes.

On constate, en effet, que les leucocytes subissent une véritable liquéfaction, et qu'il en est de même des conidies encore libres dans le sang. Au bout de deux heures environ, toutes les conidies et les leucocytes ont disparu ;

3° A mesure que les conidies disparaissent, on voit le liquide se peupler de microorganismes très différents des précédents. Ce sont des sortes de microcoques d'une taille *extrêmement faible* et réunis deux par deux par un fin tractus. Ils se déplacent dans le champ du microscope avec une grande rapidité.

L'apparition de ces petits microorganismes se fait presque toujours subitement.

C'est une sorte de phénomène explosif ; dans l'espace de 20 minutes le liquide qui n'en contenait pas en fourmille littéralement. Rappelons-le : les conidies disparaissent *d'une manière concomittante*.

Voici tout ce que j'ai pu voir chez la chenille de *Nonagria typhæ*.

Il y a une autre chenille de Lépidoptère trop connue par les ravages qu'elle exerce certaines années : celle de *Carpocapsa pomonana*, qui vit à l'intérieur des pommes dont elle provoque la chute.

Dans son sang, nous trouvons aussi de nombreuses conidies ovales analogues à celles de la *Nonagria* ; mais ici, les choses semblent se passer un peu différemment.

Le sang mélangé avec du chlorure de sodium à 6 pour 1000 montre bien des leucocytes bourrés de sphérules réfringentes, mais jamais *in vitro* je n'ai observé la phagocytose des conidies.

Celles-ci semblent subir d'elles-mêmes, probablement sous l'action du plasma, une dégénérescence, grasseuse.

On voit, en effet, les conidies, grossir et d'ovales et

(1) Cette réaction se produit d'ailleurs avec le sang de beaucoup d'insectes, mais je ne l'ai jamais vue atteindre cette intensité.

allongées devenir rondes, sphérulaires. En même temps une inclusion grasseuse ponctiforme qui existait à la partie antérieure de la conidie, grossit progressivement occupe bientôt tout le centre de la cellule, refoulant le protoplasma à la périphérie ; celui-ci ne forme plus bientôt qu'une coque mince ; enfin il disparaît totalement, la conidie a subi la dégénérescence grasseuse totale ; toute sa masse se colore maintenant en rouge par le réactif de Gueguen.

A mesure que la dégénérescence grasseuse envahit une conidie, elle perd de plus en plus sa mobilité.

Il y a enfin un fait très curieux que j'ai constaté à maintes reprises et qui est le suivant : Chaque conidie contient, à son intérieur, deux points brillants, très réfringents (1), qui auraient si l'on veut, l'apparence de spores.

Or, vers la fin du processus de dégénérescence grasseuse, elles *expulsent ces deux granulations* dans le liquide environnant.

Il est impossible de suivre avec certitude sous le microscope le sort de ces deux granulations qui sont à la limite de la visibilité, mais il est bien remarquable de constater que l'apparition des petits microcoques mobiles dans le liquide suit de près l'expulsion de ces granulations.

Retenons simplement ce fait, qui demande de nouvelles recherches pour être correctement interprété.

d) *Culture du sang*. — Ensemençons un tube de pomme de terre au liquide de Raulin avec une trace de sang recueilli aseptiquement ainsi qu'il a été dit.

A la température de 25 à 28°, la pomme de terre se couvrira en quelques jours d'un enduit vernissé et diminuera considérablement de volume dans l'espace d'une huitaine de jours. En même temps, un liquide crémeux, résultant de la liquéfaction de la pomme de terre s'accumule dans l'ampoule qui termine le tube de culture à la partie inférieure.

Fréquemment des bulles gazeuses soulèvent l'enduit vernissé qui recouvre la pomme de terre.

(1) Par exception un seul, ce qui tient probablement alors à ce que la conidie se présente mal pour l'examen.

L'examen microscopique révèle l'existence de microcoques *se colorant bien par les méthodes ordinaires*.

L'étude des mêmes microorganismes à l'état vivant et mis en suspension dans le chlorure de sodium permet de constater qu'ils se déplacent avec rapidité.

e) *Etude de la chenille au moment de la métamorphose.* — Avant de procéder à l'étude de la chrysalide, jetons un coup d'œil sur la phase intermédiaire : celle pendant laquelle la chenille cesse de manger, se ramasse sur elle-même :

1° L'examen histologique du tube digestif montre que presque toutes les cellules épithéliales de l'intestin se sont vidées de leurs microorganismes.

Les conidies n'existent plus maintenant que çà et là sous forme de petits amas.

L'examen du sang à la même période montre que le nombre des conidies qu'il contient a diminué aussi dans de très grandes proportions.

Ainsi, il semble bien qu'il existe une relation directe entre le nombre de conidies du sang et la quantité de celles-ci qui peuvent traverser l'épithélium intestinal dans un temps donné (1).

(1) J'ai constaté également que les conidies du sang diminuaient de nombre chez une chenille mal nourrie depuis quelques jours.

CHAPITRE II

ÉTUDE DE LA CHRYSALIDE

On sait que quand une chenille est arrivée à toute sa taille, elle cesse de manger, elle expulse par l'anus les derniers résidus de la digestion, et enfin, après une période d'immobilité très variable suivant l'espèce considérée, la peau de la chenille se fend et l'enveloppe chitineuse de la chrysalide qui s'est formée en dessous apparaît à découvert.

A l'intérieur de cette nouvelle enveloppe, la plupart des organes de la chenille subissent une liquéfaction (histolyse) et l'insecte est ensuite reconstruit sur un nouveau plan : le papillon se forme.

Si, quelques heures après la formation d'une chrysalide quelconque, on vient à prélever aseptiquement une petite quantité de la bouillie blanchâtre qui la remplit, on constate que ce liquide contient des microorganismes que la culture peut mettre en évidence. Ce sont les bactéries qui étaient restées adhérentes au tube digestif et qui ont été emprisonnées dans la nouvelle enveloppe au moment de la métamorphose.

Cependant, dans l'espace de quelques jours (ordinairement deux à trois jours), il se produit une autopurification de la chrysalide ; les tentatives de culture restent maintenant négatives (1).

Tels sont les faits classiquement admis. J'ai vérifié à

(1) En employant tout au moins les procédés de culture classiques. Je crois devoir faire, dès maintenant, cette restriction qui s'expliquera par un travail ultérieur.

plusieurs reprises leur exactitude sur la chrysalide de *Vanessa urticae*.

Il était utile de rappeler ces faits étant donné l'intérêt qu'ils présentent dans le cas qui nous occupe.

Nous allons, en effet, attendre une huitaine de jours afin d'être bien certains que notre chrysalide ait subi son « auto-purification », puis nous procéderons à l'étude microscopique et bactériologique de son contenu.

a) *Examen microscopique.* — Ouvrons aseptiquement une chrysalide prise dans les conditions spécifiées. Délayons une petite quantité de la bouillie blanche qu'elle renferme dans le chlorure de sodium stérile à 6 pour 1000 ; l'examen microscopique révélera immédiatement la présence de nombreux microorganismes et nous pouvons nous convaincre que ce sont bien ceux que nous connaissons déjà à savoir les conidies ovales et les microcoques toujours très mobiles qui traversent rapidement le champ de la préparation.

Si nous voulons colorer ces microorganismes, nous nous heurtons aux mêmes difficultés que précédemment, et nous sommes obligés d'employer les procédés spéciaux déjà indiqués.

b) *Culture des microorganismes.* — Déposons une parcelle de la bouillie blanche prélevée aseptiquement à l'intérieur de la chrysalide sur une pomme de terre au liquide de Raulin. Après un séjour de deux jours à 25°, nous voyons apparaître au point d'ensemencement une petite perle brillante quelquefois jaune, d'autres fois rosée. Elle est formée par un enduit crémeux qui, délayé dans le chlorure de sodium à 6 pour 1000 montre nos microcoques mobiles qui sont ici extrêmement nombreux et aussi nos conidies ovales.

Chose remarquable, une préparation faite par la méthode ordinaire : étalage sur une lame, fixation au mélange d'alcool absolu et d'éther, coloration par le violet de gentiane, la thionine, etc., donne d'excellents résultats, nos microorganismes ne semblent plus maintenant posséder la capsule qui s'opposait à la pénétration des réactifs colo-

rants, ils l'ont perdue en cultivant sur le milieu artificiel.

Attendons encore quelques jours, nous verrons apparaître au pourtour de la perle brillante des filaments blancs indiquant l'apparition d'une Mucédinée. Les filaments sont souvent agrégés en pinceau, fasciculés.

Au bout de quelques jours, nous prélevons quelques spores au moyen d'un fil de platine stérile et nous ensemençons sur une nouvelle pomme de terre. Les mêmes phé-

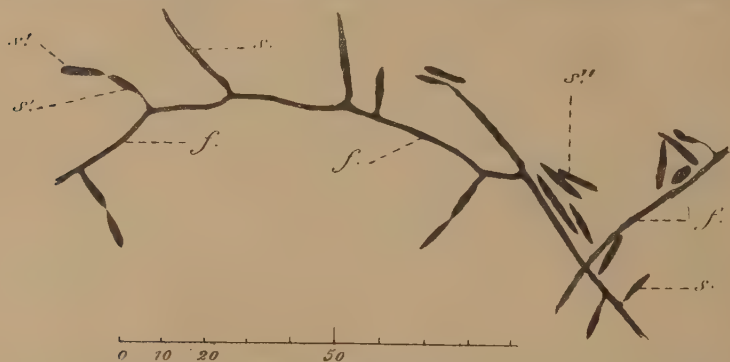


Fig. 4. — Culture en cellule de l'*Isaria* provenant de la germination des conidies de *Nonagria typhae*. *f*, filaments mycéliens; *s*, conidie insérée sur le filament; *s'*, conidie double; *s'''*, conidies détachées du mycelium.

nomènes se reproduisent : apparition de la perle d'aspect vernissé, puis de la Mucédinée.

Une culture en cellule sur liquide de Raulin donne un champignon représenté ci-contre (fig. 4). On voit que c'est une *Isaria* typique. Sur un filament cloisonné *f*, *f*, sont insérées des spores elliptiques *s*, *s*, disposées parfois deux par deux *s'*, *s'*.

Si on examine la culture en cellule à l'état vivant, à la température de 25°, on voit parfaitement que les spores une fois formées se détachent du filament mycélien et se meuvent dans le liquide avec l'allure particulière que nous avons déjà comparée à celle des Diatomées.

Elles vont alors souvent s'amasser par groupes à l'intersection de deux filaments mycéliens. On voit que la culture obtenue est absolument pure.

C'est d'ailleurs l'avis de tous les mycologues auxquels j'ai montré mes préparations.

Toutes les chrysalides de *Nonagria typhæ* examinées remuaient énergiquement et paraissaient en excellente santé; elles ont fourni en culture le même *Isaria*.

Celui-ci pousse d'ailleurs très facilement sur les divers milieux usités en bactériologie : gélatine, gélose, carotte, etc.

Un caractère commun à toutes ces cultures est le suivant : la Mucédinée couvre tout le substratum d'un duvet blanc soyeux, puis, peu à peu, à mesure que la culture vieillit, les perles vernissées reparaissent, empiètent sur le champignon, et à la fin, on retrouve l'aspect que nous avons obtenu avec l'ensemencement du sang : la surface de la pomme de terre subit une véritable fonte qui, de jour en jour attaque des couches plus profondes, si bien que la tranche de tubercule a bientôt presque complètement disparu.

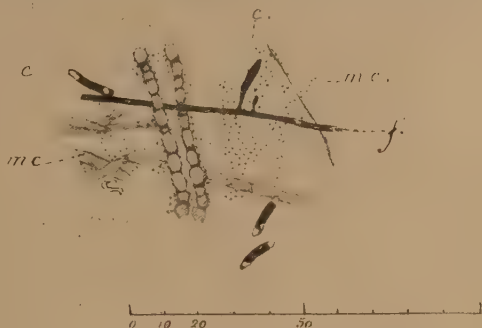


Fig. 5. — Culture en cellule obtenue par prélèvement direct du liquide blanc laiteux contenu dans la chrysalide.
f, filaments mycéliens du champignon; c, conidies de l'*Isaria*.
m. c, microcoques.

Ces modifications révèlent l'existence d'une *cytase* (*cellulase*) qui attaque énergiquement les parois des cellules de la pomme de terre.

On peut, pour faire la culture en cellule, partir directement de la bouillie blanche prélevée à l'intérieur de la chrysalide.

On voit alors parfaitement les conidies germer et produire un mycelium cloisonné qui donne les spores d'*Isaria* identiques aux précédentes.

Mais de plus, disposés le long des filaments du champignon, on aperçoit les microcoques que nous avait déjà révélés l'examen de l'enduit vernissé.

On obtiendrait une culture identique en touchant au moyen d'un fil de platine non plus l'extrémité des filaments de la mucédinée (culture sur pomme de terre), mais la *base*

des mêmes filaments, car, alors on rencontrerait avec son fil l'enduit vernissé qui contient les microcoques.

Il est difficile d'obtenir en cultures pures et séparément sur pomme de terre ou sur gélatine le champignon et le microcoque. Je n'y suis pas parvenu moi-même.

M. Sartory, plus entraîné que moi aux manipulations bactériologiques a bien voulu me prêter son concours. Il est arrivé à séparer les deux microorganismes. Le microcoque cultive sur pomme de terre avec production de gaz (probablement C H_4).

Dans la nature, le champignon et le microcoque marchent toujours de pair. On les rencontre ensemble dans tous les tissus et nous verrons que, au moment où l'*Isaria* fructifie à l'extérieur de la chrysalide, il porte le microcoque sur ses filaments aériens.

CHAPITRE III

ÉTUDE DE L'INSECTE PARFAIT

Le papillon sort enfin de sa chrysalide. Il développe ses ailes, il est d'une fraîcheur admirable ; ce n'est certainement pas un insecte malade, envahi par une infection quelconque.

a) *Examen microscopique des divers organes.* — Ou-

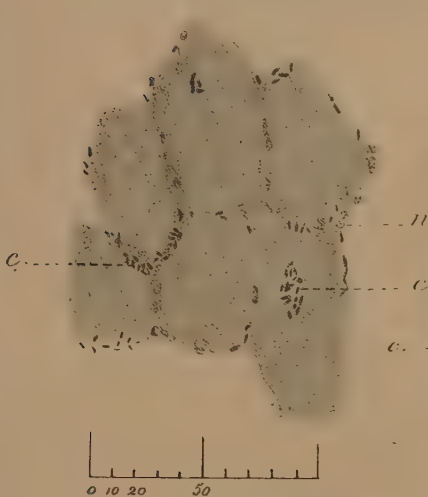


Fig. 6. — Coupe du tissu musculaire strié de *Nonagria typhæ* (Imago ♀).

c, conidies contenues entre les faisceaux musculaires ; c', conidies renfermées dans l'intérieur du muscle ; n, noyaux.



Fig. 7. — Coupe d'un ganglion du système nerveux abdominal de *Nonagria typhæ* (Imago ♀).

c, conidies situées à la périphérie du ganglion.

vrons-le et fixons immédiatement des fragments des divers organes dans le liquide de Bouin, puis colorons les coupes obtenues au moyen de l'hématoxyline ferrique.

L'examen microscopique nous montrera immédiatement que tous les tissus examinés contiennent des conidies.

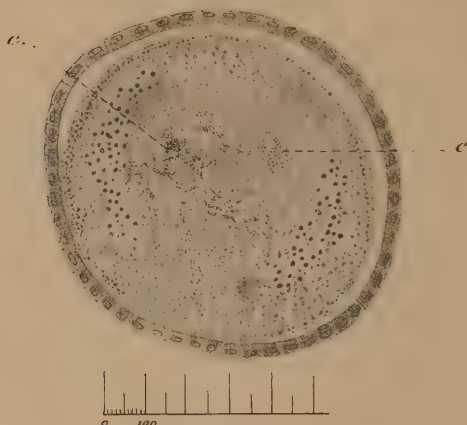


Fig. 8. — Coupe d'un œuf extrait de l'ovaire d'une femelle de *Nonagria typhae* qui vient d'éclore.
c, conidies réparties en amas au centre de l'œuf.

Le tissu adipeux très abondant chez ces papillons en contient un grand nombre, toujours réparties par flots.

Le tissu musculaire strié (fig. 6) contient les microorganismes surtout dans les intervalles qui séparent ces faisceaux (fig. 6 c); ils voisinent alors avec les noyaux n; plus rarement les conidies

sont contenues au milieu du faisceau (fig. 6 c').

Le système nerveux lui-même n'est pas épargné. La

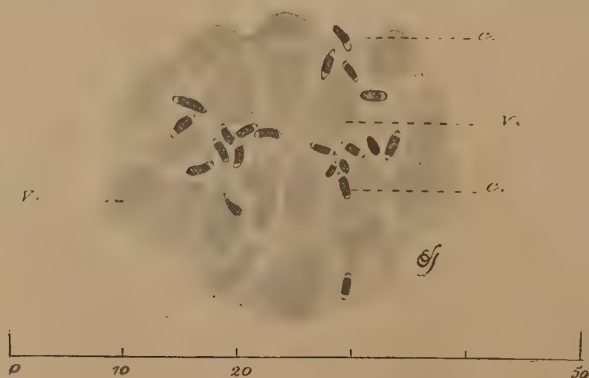


Fig. 9. — Portion de la figure précédente très grossie.
c, conidies; v, sphères vitellines.

(fig. 7 c, c) montre que les conidies existent surtout à la *périphérie des ganglions*.

L'œuf enfin chez la femelle qui vient d'éclore renferme de nombreuses conidies. Elles sont disposées en amas surtout au centre (c, c fig. 8)

La figure 9 montre les mêmes microorganismes vus à un fort grossissement. On voit que les conidies dont le centre s'est teint plus vivement que les extrémités par la laque ferrique sont contenues entre les sphérules de vitellus.

Un grand nombre de papillons, tous bien développés et ayant une apparence de santé parfaite ont été examinés par la méthode rapide de la dilacération et coloration avec le bleu Cotton dissous dans l'acide lactique.

Chez tous, sans exception, j'ai reconnu la présence de conidies dans les divers tissus ; en particulier, elles ne manquent jamais dans l'œuf.

b) *Culture des tissus de l'Imago.* — Avec des ciseaux flambés, on sectionne l'abdomen du papillon qui vient d'éclore ; on prélève quelques parcelles de viscères avec une anse de platine stérile qui sert à ensemercer le milieu choisi.

On obtient à coup sûr le développement de l'*Isaria* qui possède exactement les caractères cultureux déjà indiqués.

Toujours l'enduit crémeux où formillent les microcoques mobiles apparaît d'abord, le développement du champignon se produit ensuite.

c) *Développement spontané de la Mucédinée dans les tissus du papillon.* — Piquons le papillon quelques heures après son éclosion au moyen d'une épingle qu'on passe auparavant à la flamme. Il meurt bientôt et, au bout de quelques jours, la petite quantité d'eau contenue dans ses tissus s'est évaporée en grande partie.

Abandonné en cet état dans une boîte de collection, l'insecte « tourne au gras » ; c'est le phénomène que nous avons décrit en commençant. L'étude de ce processus devra être approfondie aussi bien au point de vue morphologique qu'au point de vue chimique. Il semble d'après les premières constatations que j'ai faites qu'il y ait, au début, multiplication très active des conidies qui se nourrissent aux dépens des divers tissus de l'hôte.

Les choses semblent en rester là si l'insecte est conservé dans une atmosphère sèche.

Mais si on vient à le transporter dans une atmosphère

saturée de vapeur d'eau et qu'on le place à la température de 25 à 30°, on ne tarde pas à voir les différentes parties du corps, mais surtout l'abdomen se couvrir d'une Mucé-dinée d'un blanc jaunâtre.

En ensemençant celle-ci sur pomme de terre Raulin, on obtient une culture qui est presque toujours impure (1), mais dans laquelle on retrouve *constamment* l'*Isaria* spécial et bien caractérisé que nous suivons depuis la chenille.

Ici encore, remarquons-le, on retrouve *toujours* l'enduit crémeux avec les microcoques mobiles.

J'ajoute enfin que dans les cultures pures obtenues en séparant l'*Isaria* des autres moisissures, on passe facilement de la forme *Isaria* à la forme *Botrytis*.

d) *Culture des déjections de la chenille.* — Nous sommes partis des déjections de la chenille; nous y revenons pour fermer le cycle.

Si nous cultivons ces déjections, nous obtenons encore, cela va de soi, une culture souvent impure, mais *toujours* nous en pouvons isoler notre *Isaria* spécifique qui, ici encore, possède tous ses caractères cultureux, notamment les perles crémeuses riches en microcoques.

(1) En particulier presque constamment souillée par des *Penicillium*. Le fait n'a pas lieu de surprendre, le papillon abandonné un certain temps à l'air libre a forcément contaminé son tégument externe sur lequel on prélève la semence.

CHAPITRE IV

RÉSUMÉ — CONCLUSIONS

1° Résumé des notions acquises

Les chenilles de la *Nonagria typhæ* vivent aux dépens de la moelle contenue au centre des tiges du *Typha latifolia*.

Dans leur tube digestif existent en très grande quantité les conidies d'un *Isaria*, qui vivent au milieu des fragments de moelle.

Ces conidies sont toujours accompagnées d'un microcoque qui secrète une diastase capable de solubiliser la cellulose.

Les conidies vivent et grossissent aux dépens des matières nutritives mises ainsi à leur disposition.

Elles pénètrent alors dans les cellules épithéliales de l'intestin, arrivent dans le sang, où elles sont phagocytées et subissent la dégénérescence graisseuse.

Chez d'autres espèces (*Carpocapsa pomonana*), la dégénérescence semble se faire au contact du plasma.

D'autres conidies vont s'enkyster dans les cellules des différents organes de la chenille.

Après la transformation en chrysalide, les bactéries banales contenues dans le tube digestif sont détruites ; il se produit une auto-purification. Seules les conidies persistent vivantes ainsi que les microcoques et fournissent une culture pure (ou plutôt une culture de deux organismes associés). Dans l'insecte parfait, les conidies persistent vivantes ; elles existent enkystées dans les différents tissus, en particulier au centre de l'œuf.

Elles envahiront les différents organes de la jeune che-

nille ; au moment de l'éclosion ; elles passeront dans la lumière du tube digestif où elles se trouveront en contact avec les matériaux nutritifs à « travailler » chimiquement.

Après la mort du papillon, si celui-ci est placé dans des conditions d'humidité favorables, les conidies germent, les filaments mycéliens s'ouvrent un chemin à travers les parties les plus minces de la cuticule chitineuse et le champignon vient donner ses spores à l'extérieur. Celles-ci assureront la dissémination du cryptogame.

Il s'agit donc bien d'une véritable symbiose entre un champignon, un microcoque et un insecte.

Le microcoque fournit des diastases capables de solubiliser la cellulose ; une grande partie des conidies du champignon sert de nourriture aux cellules de l'hôte. Par contre, l'insecte offre au champignon des matériaux nutritifs dans un état de grande division, ce qui multiplie la surface d'attaque ; au moment de la transformation en chrysalide, il détruit toutes les espèces banales supprimant ainsi toute concurrence vitale pour l'*Isaria*. Il le tient à l'abri dans l'intérieur de sa cuirasse chitineuse ; il le conserve d'une année à l'autre (dans l'intérieur de l'œuf).

Au moment de la mort de l'insecte parfait, les conidies germent à l'état de pureté dans un milieu éminemment favorable. Elles viennent alors former à l'extérieur leurs spores qui peuvent être disséminées par les agents atmosphériques.

C'est bien là le type d'une association à bénéfice réciproque.

2^o Caractère de généralité des phénomènes observés

Il va sans dire que le temps m'a manqué jusqu'à présent pour poursuivre, avec détail, l'étude des mêmes phénomènes chez d'autres espèces de chenilles xylophages.

J'ai cependant glané çà et là un nombre de faits assez grand pour qu'il me soit permis d'affirmer que les phénomènes précédemment décrits se reproduisent (avec quelques

variantes dans le détail) chez toutes les chenilles xylophages, et même aussi chez les larves d'insectes de groupes différents.

A mesure qu'on progresse dans cette étude, on arrive à cette conclusion que chaque espèce possède *son Isaria* particulier parfaitement distinct de ceux des espèces voisines.

J'ai fait figurer ici l'espèce qui vit en symbiose avec la *Sesia apiformis* (1). On voit qu'il possède des spores beaucoup plus arquées que celles de l'*Isaria* provenant de la *Nonagria typhæ*.

Toutes les Sésies possèdent des *Isaria* symbiotiques ana-



Fig. 1b. — Culture en cellule de l'*Isaria* provenant de la germination des conidies de la *Sesia apiformis*.
f, filaments mycéliens ; c, conidies.

logues et chez *toutes*, dans les cultures, on retrouve la perle d'enduit crémeux riche en microcoques (2).

Tous ces papillons placés, après leur mort, dans des conditions d'humidité favorables se couvrent complètement des filaments d'une Mucédinée blanche; la culture de ce champignon montre toujours que c'est l'*Isaria* spécifique fourni par la chenille et la chrysalide.

(1) On remarquera que, pour le moment, je m'abstiens de toute description détaillée, et surtout de toute détermination spécifique. Je fais de la mycologie en physiologiste, et je ne me reconnais pas, en systématique, la compétence suffisante pour créer de nouvelles espèces. Toute cette question sera traitée plus tard en collaboration avec M. Sartory.

(2) Je ne saurais trop insister sur ce fait. Il existe même pour les champignons symbiotiques de certains micro-lépidoptères à mode de nutrition très spécial et très curieux dont je publierai prochainement l'étude.

3^o Rapport des *Isaria* et des Insectes

CONCEPTION ANCIENNE ET CONCEPTION NOUVELLE

De l'ensemble des travaux anciens (qui, je le répète, ne seront pas analysés en détail) se dégageait la conception suivante des *Isaria* :

1^o *Au point de vue morphologique.* les *Isaria* sont des Mucédinées qui peuvent exister sous deux formes ; forme *Isaria* proprement dite, qui est une forme conidiale agrégée ; forme *Botrytis* qui est une forme conidiale à hyphes simples.

Dans certaines conditions particulières, la Mucédinée précédente peut donner une forme ascosporee (*Cordyceps*) ; cette dernière forme, beaucoup plus parfaite que les précédentes, n'est pas encore connue pour toutes les espèces.

On voit donc que, suivant l'expression de Fries (cité par COSTANTIN (1888), ces champignons, en raison de leur polymorphisme peuvent être qualifiés de *protées*.

Il est même essentiel de remarquer que la disposition agrégée des filaments sporifères, est un caractère très contingent qui peut appartenir à des champignons de groupes très différents. On peut observer des formes *Isaria* appartenant à des Sporotrichées, à des Sporophorées, à des Phialidés, à des *Penicillium*, etc. VUILLEMIN (1911) vient de publier encore récemment à ce sujet un nouveau travail très documenté ;

2^o *Au point de vue physiologique,* le caractère principal des *Isaria*, est d'être des *champignons pathogènes pour les Insectes*. C'est là la notion qui paraît dominer toute leur histoire, c'est une notion physiologique qui paraît même influencer les mycologues qui s'occupent de systématique. On donne à l'un d'eux le nom d'*Isaria destructor*. Metschn.

Dès que la multiplication d'un insecte devient un fléau pour l'agriculture, on propose de répandre à profusion les spores d'un *Isaria*.

METSCHNIKOFF obtient par ce moyen de très bons résultats pour la destruction du charançon de la betterave (*Cleonus*

punctiventris) KRASSILTSCHIK pour celle du hanneton des blés (*Anisoplia austriaca*).

GIARD (1893) publie de nombreux travaux à ce sujet et fait une ardente campagne préconisant l'emploi des spores de l'*Isaria densa* pour la destruction des larves du Hanneton.

PRILLIEUX, DELACROIX s'occupent à la même époque de résoudre la même question par les mêmes procédés.

Tous ces expérimentateurs s'assurent que les larves peuvent être facilement infectées par le contact des spores d'*Isaria*.

Comment admettre que tant d'éminents biologistes se soient trompés ?

Et d'ailleurs, ne connaît-on pas une maladie contagieuse qui sévit de temps à autre sur les vers à soie : la *muscardine*. Or, on sait depuis les travaux de BASSI (1835) que cette maladie est causée par un champignon parasite que BALSAMO CRIVELLI montra être un *Botrytis* auquel il donna le nom de *Bassiana* en l'honneur de celui qui l'avait découvert.

Ainsi, en deux mots, on considérait jusqu'ici les *Isaria* comme des Mucédinées capables de revêtir, suivant les circonstances, de multiples aspects, et, d'autre part, possédant pour les insectes une action pathogène indéniable.

Voici d'autre part que les recherches exposées ci-dessus me conduisent à admettre que les *Isaria* sont, pour certains insectes, tout au moins, des hôtes *normaux, héréditaires, jouant un rôle important dans la nutrition de l'animal* ; des champignons qui, non seulement ne tuent pas l'insecte, mais semblent indispensables à son existence.

Ces deux conceptions semblent tout à fait inconciliables au premier abord ; je pense qu'une étude plus approfondie permettra de tout éclaircir et que les contradictions signalées s'évanouissent.

Je ne puis aujourd'hui apporter une solution définitive au problème, j'indiquerai seulement brièvement l'*opinion provisoire* que des recherches en cours m'ont suggérée. Il est probable que certains points de détail seront modifiés par la suite de l'expérimentation.

Il y a d'abord un fait bien remarquable que pourront facilement vérifier tous ceux qui élèvent des larves d'insectes et que, cependant, je n'ai jamais vu signaler nulle part. C'est le suivant : *les déjections de ces larves ne se couvrent jamais de Mucédinées.*

L'examen microscopique montre que toutes ces déjections fourmillent de conidies ; aucun de ces microorganismes ne végète pour fournir la Mucédinée correspondante. Si ces déjections se sont rapidement desséchées et sont gardées en cet état, le fait n'est pas surprenant, mais je conserve depuis des mois à l'air libre des déjections placées à l'ombre qui souvent sont mouillées par la pluie sans qu'aucune se soit couverte des filaments mycéliens d'un champignon. Ces mêmes déjections placées sur un milieu de culture convenable donnent rapidement naissance au champignon qui résulte de la germination des conidies.

Il semble donc que les déjections soient imprégnées d'une substance qui s'oppose au développement du champignon sous sa forme mycélienne, *tout en le laissant se multiplier sous sa forme conidienne.* Cette substance existerait aussi dans les humeurs de l'insecte. Elle disparaîtrait rapidement après la mort de l'*imago*, et alors le champignon prendrait aussitôt la forme filamenteuse et produirait ses spores.

Celles-ci sont alors capables d'infecter un insecte appartenant à la même espèce ou à toute autre.

C'est ainsi que j'ai pu, à plusieurs reprises, produire une infection muscarinienne typique en projetant sur des chenilles de *Vanessa Io* des spores provenant de l'*Isaria* de *Nonagria typhæ* (1).

En captivité, lorsqu'on conserve une chenille dans un espace restreint, insuffisamment ventilé, il arrive que les déjections entrent en contact avec des matières alimentaires qui servent de milieu de culture au champignon ; celui-ci donne ses spores, et la chenille meurt d'auto-infection.

(1) J'ai même observé au cours de ces expériences un fait bien curieux. Quand une chenille est infectée peu de temps avant une mue ou sa métamorphose en chrysalide, la transformation qu'elle devait subir est certainement hâtée par l'infection. Le rejet de la dépouille chitineuse imprégnée des spores d'*Isaria* sauve quelquefois la larve qui eût fatalement péri sans cela. C'est la tunique de Nessus dans le monde des insectes.

C'est ce que j'ai observé bien involontairement, et à mon grand regret tout dernièrement pour des chenilles de *Cossus ligniperda* qui m'étaient précieuses pour des expériences en cours.

Trois de ces chenilles sont mortes envahies par les spores de la Mucédinée dont les conidies existent normalement dans leur intestin.

En résumé, la spore de la Mucédinée (et probablement plus spécialement la spore de la forme *Botrytis* produisent une infection mortelle chez un insecte de la même espèce ou d'une autre espèce en germant sur le tégument ou bien plutôt, à mon avis, en pénétrant par les ouvertures stigmatiques.

Quant à la substance qui, dans les tissus, maintiendrait le champignon à l'état de conidie, j'espère apporter prochainement la preuve certaine qu'elle n'est nullement hypothétique.

Il existe en effet chez la chenille du *Cossus* en dehors des glandes filières, une seconde paire de glandes qui sont extrêmement développées. Elles avaient été très bien vues par LYONNET (1762) ; elles ont été étudiées au point de vue histologique par HENSEVAL (1897 a).

Ces glandes sécrètent un liquide à odeur très pénétrante et extrêmement désagréable qui a été étudié par PLATEAU (1875) et surtout par HENSEVAL (1897 b) qui a montré que c'était une essence qui aurait une formule voisine de $C^{22}H^{35}S$.

Or, chose curieuse, j'ai retrouvé les mêmes glandes très développées chez toutes les chenilles xylophages où je les ai cherchées. Elles ont en particulier une grande longueur chez les chenilles de *Nonagria typhæ*.

D'après les premières constatations que j'ai pu faire, une trace d'essence incorporée à un milieu de culture n'empêcherait pas la multiplication de la forme conidienne. mais il s'opposerait à l'apparition de la forme mycelienne et par conséquent à l'apparition des spores de *Botrytis* (1).

(1) HENSEVAL (*loc. cit.*) relate dans son mémoire que le développement de divers microbes n'est pas empêché par l'essence de *Cossus*, non plus que celui d'un *Penicillium* et d'un *Aspergillus*. Au contraire l'*Oospora cinamomea*, champignon parasite des insectes est presque complètement entravé dans son développement par la même essence.

4° Conclusions générales

1° Dans le contenu intestinal des chenilles xylophages (*Nonagria*, *Sesia*, etc.) on rencontre constamment des conidies mobiles qui, par culture donnent un *Isaria*.

On rencontre en outre un microorganisme de plus petite taille qui attaque vivement la cellulose avec production de gaz. (Microcoque, diplocoque).

2° Les conidies après s'être développées aux dépens des matériaux cellulosiques solubilisés traversent les parois intestinales. Elles arrivent dans le sang où elles sont phagocytées et transformées en lipoides qui servent à la nourriture des tissus de la chenille.

Quelques-unes des conidies échappent à la phagocytose et s'enkystent dans les tissus.

3° A l'intérieur de la chrysalide, on trouve une culture pure de conidies (associées aux microcoques).

Ces conidies peuvent donner directement des cultures en cellule.

4° Les conidies se retrouvent vivantes dans les tissus de l'insecte parfait. Elles existent en particulier constamment au centre de l'œuf, assurant ainsi par hérédité la symbiose qui existe entre la chenille et le champignon.

5° Le papillon mort, s'il est placé dans des conditions convenables d'humidité, les conidies germent, produisent un mycelium qui traverse la cuticule et vient à l'extérieur donner ses spores. (Forme *Isaria* ou plus fréquemment *Botrytis*) ;

6° Les spores provenant de ces Mucédinées sont capables d'infecter un insecte de la même espèce ou d'une espèce voisine en pénétrant par ses stigmates ;

7° Chez la larve en bonne santé, les conidies des déjections ne germent jamais pour donner l'*Isaria*.

Il est probable que la substance qui s'oppose au développement du champignon dont les spores seraient néfastes à l'insecte est une essence sécrétée par une paire de glandes spéciales (Glandes labiales) très développées chez la

chenille de *Cossus* et chez toutes les chenilles xylophages.

8° L'étude méthodique des insectes xylophages fournira sans doute une série d'espèces d'*Isaria* et de champignons voisins. Ils seront définis non seulement par leurs caractères botaniques, mais par *leur origine*. La nymphe ou chrysalide sera le stade de choix pour cette étude.

APPENDICE

Le parasitisme normal dans la série animale

a) *Le parasitisme normal chez les insectes en général.*

La présence, dans les tissus des insectes normaux, de corpuscules présentant l'apparence de bactéries a été signalée depuis longtemps.

Il semble que ce soit WEISSMANN (1863) qui, le premier, les ait indiqués dans les œufs de Diptère.

Mais c'est surtout chez les Aphidiens et les autres Hémiptères que leur présence fut remarquée par une série d'auteurs.

BALBIANI (1866) étudiant le développement parthénogénésique des Pucerons découvre dans la masse du pseudo-vitellus ou masse verte des bâtonnets réfringents qu'il assimile à des éléments mâles rudimentaires.

CLAPARÈDE (1867) émet l'hypothèse que ce sont des parasites.

Ils sont revus incidemment par divers auteurs qui émettent sur leur nature les opinions les plus diverses, si bien qu'à une époque très rapprochée, HENNEGUY (1904), dans son traité sur les Insectes, déclare ne pouvoir se prononcer avec certitude sur la signification de ces corpuscules bactéroïdes.

CONTE et FAUCHERON (1907) signalent la présence de levures dans le corps adipeux des Coccides.

Mais les travaux qui apportent des données certaines sur la véritable nature de ces formations énigmatiques datent d'une époque très récente.

PIERANTONI (1910) étudie ces corpuscules dans la masse du pseudo-vitellus de *Icerya purchasi*. Il montre que ce sont des Blastomycètes qui peuvent cultiver et qui se transmettent héréditairement par l'œuf.

SULC (1910 *a* et *b*) signale également la présence de *Saccharomycètes* symbiotiques chez une série d'Homoptères, et d'Aphides ; son mémoire renferme nombre de faits intéressants.

Mais tous ces auteurs avouent n'avoir pu pénétrer la signification physiologique de cette union entre le champignon et l'insecte. On voit bien la protection et la nourriture abondante que le champignon reçoit de l'insecte, mais quel avantage, ce dernier retire-t-il de cette union ? Sulc propose, sans y tenir beaucoup, semble-t-il, l'hypothèse que la levure, en vertu de son rôle bactéricide, protège l'insecte contre l'infection. Pierantoni émet l'hypothèse que la levure intervient dans les processus métaboliques des matières sucrées.

On voit, en somme, que le rôle physiologique reste fort obscur.

Après les Hémiptères, ce sont les Orthoptères, dont les tissus se montrent le plus souvent envahis par les microorganismes.

CUÉNOT (1892) et son élève MERCIER (1906, 1907) publient une série de fort intéressants mémoires sur la présence de bactéries dans le tissu adipeux et l'œuf de la Blatte.

Les Coléoptères donnent lieu à beaucoup moins de travaux ; je n'ai guère relevé que celui de ESCHERICH (1900) sur l'épithélium digestif de l'*Anobium paniceum*.

Citons enfin les travaux de BLOCHMANN sur la présence d'organismes bactériens dans l'œuf et le tissu adipeux de divers insectes.

Il semble que, jusqu'au travail que je présente, aucun cas de symbiose n'ait été signalé entre les Lépidoptères et les microorganismes végétaux.

Aucune explication rationnelle de la symbiose physiologique n'avait non plus été fournie.

Je compte apporter prochainement des informations précises sur la signification de la symbiose chez les Hémiptères.

b) *Le parasitisme normal chez les autres invertébrés.*

GARNAULT (1887) signale la présence de bactéries dans les cellules de l'organe excréteur d'un mollusque : le *Cyclostoma elegans*.

MERCIER (1911) vient de reprendre cette étude.

c) *Le parasitisme normal chez les Vertébrés.*

C'est une notion classique que les humeurs et les tissus des Vertébrés, en bon état de santé sont aseptiques.

En ce qui a trait aux Mammifères, cette asepsie a été longtemps un article de foi, une notion intangible. C'est qu'en effet, cette asepsie constatée par Pasteur dans des expériences célèbres, avait contribué à réfuter la théorie de la génération spontanée.

Trouver des bactéries vivantes dans les organes sains des Mammifères, c'était s'attaquer au dogme. Il en est résulté que plusieurs travaux qui semblent conduits avec une technique impeccable ont été, pendant longtemps, relégués dans l'oubli, sans qu'on ait pris le soin de les discuter ou de les vérifier.

Il me semble juste de citer tout d'abord, à ce point de vue, les recherches de GALIPPE qui, de 1883 à 1895, a publié une série de travaux qui ont paru dans le *Journal des Connaissances médicales*. Les tissus ou les humeurs prélevés avec les plus minutieuses précautions d'asepsie étaient enfermés dans un vase stérile, abandonnées à eux-mêmes pendant quelques jours (pour permettre aux microorganismes présents de se développer dans leur milieu naturel, puis additionnés d'une certaine quantité de bouillon stérile).

Très-souvent, les résultats obtenus furent positifs, même pour les tissus prélevés chez les fœtus normaux. Chose curieuse, les testicules se montrèrent comme un des organes les plus régulièrement envahis par des bactéries.

Citons aussi les recherches de RICHET, RICHET et OLIVIER (1882, 1883) sur les microbes des poissons, celles de DESOUBRY et PORCHER (1895) faites sous la direction de Nocard.

Enfin, les intéressantes recherches de G. BERTRAND (1901) sur l'action des microbes du testicule sur la glycérine.

J'arrête là ces citations incomplètes, et je renonce à effleurer ce sujet pour le règne végétal.

Qu'il me suffise de rappeler les travaux de Bonnier sur les Lichens, de Noël Bernard sur la tubérisation, de Leclerc du Sablon sur l'albumen du Caprifiguiier, de Molliard sur les cécidies florales et une très intéressante note de S. Artault de Vevey (1900).

On voit que cette question du parasitisme normal, et surtout]de la symbiose entre les champignons et les autres êtres, existe dans toute l'étendue de la série des êtres.

Longtemps méconnue, elle attire et passionne de plus en plus les chercheurs. Il y a là pour employer une comparaison tirée de ce travail, un *Isaria* encore enfermé presque entièrement dans sa chrysalide; le temps est proche où il va s'épanouir de tous côtés au grand jour aux yeux étonnés de ceux qui n'auront pas soupçonné son développement.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1900. ARTAULT DE VEVEY (D^r STEPHEN). Existe-t-il un ferment lipogène. (*C. R. Soc. Biol.* 1900., t. LII, p. 551).
1866. BALBIANI. Sur la reproduction et l'embryogénie des Pucerons. (*C. R. Ac. sci.* T. LXII, p. 1285, 1231, 1390).
1869. BALBIANI. Mémoire sur la génération des Aphides. (*Ann. Sci. nat. Zool.*, t. XI, XIV, XV)
1901. BERTRAND (GABRIEL). Sur une ancienne expérience de H. Berthelot, relative à la transformation de la glycérine en sucre par le tissu testiculaire. (*Comp. rend. Acad. sci.*, t. CXXXIII, p. 887).
1887. BLOCHMANN (D^r F.). Ueber das regelmässige Vorkommen von bakteriennähnlichen Gebilden in den Geweben und Eiern verschiedener Insecten. *Zeitschr. für. Biologie*).
1867. CLAPARÈDE: Note sur la reproduction des Pucerons. (*Ann. sc. nat. Zool. Série V.* t. VII, p. 21).
1907. CONTE (A.) et FAUCHERON (L.). Présence de levures dans le corps adipeux de divers Coccides. (*C. R. Ac. sci.* CXLV, p. 1223).
1888. COSTANTIN (J.). Les Mucédinées simples. (Paris, Klincksieck).
1892. CUÉNOT. Etudes physiologiques sur les Orthoptères. (*Arch. de Biol.* t. XIV, p. 293).
1895. DESOUBRY (G.) et PORCHER (Ch.). De la présence de microbes dans le chyle normal chez le chien. (*C. R. Soc. biol.*, t. XLVII, p. 101).
1900. ESCHERICH. Ueber das regelmässige Vorkommen von Sprosspilzen in dem Darmepithel eines Käfers. (*Anobium paniceum*). (*Biolog. Zent. Bd.* XX).
1891. GALIPPE (D^r V.). Note sur une nouvelle méthode de recherche des micro-organismes pouvant exister dans les tissus vivants normaux, d'origine végétale ou animale, dans les tissus pathologiques, ainsi que dans les sécrétions et dans les humeurs. (*C. R. Soc. biol.*, p. 810).
1892. GALIPPE. Sur la présence de parasites dans les fœtus normaux. (*Soc. biol. et Journal des connaissances médicales*).
1895. GALIPPE. Note sur le parasitisme normal. (*Journal des connaissances médicales*).
1887. GARNAULT. Recherches anatomiques et histologiques sur le *Cyclostoma elegans*. (*Thèse Fac. sci.*, n° 587. Série A, n° 89).
1893. GIARD (ALFRED). L'*Isaria densa* (Link.) Fries. Champignon parasite du Hanneton commun (*Melolontha vulgaris*). (*Bulletin Scientifique de la France et de la Belgique.* T. XXIV). [On trouvera dans ce mémoire des indications bibliographiques assez complètes sur la question des champignons entomophytes].
1906. GUEGUEN (F.). Emploi du Sudan III, comme colorant mycologique, seul ou combiné au bleu coton et à l'iode. (*Bull. soc. myc.* t. XXII, p. 224).

1904. HENNEGUY (Félix). Les Insectes. (Paris, MASSON).
- 1897 a. HENSEVAL (MAURICE). Les glandes à essence du *Cossus ligniperda*. (*La Cellule*. t. XII, p. 19).
- 1897 b. — Recherches sur l'essence du *Cossus ligniperda*. (*La Cellule*. t. XII, p. 169).
1895. LINDNER (P.): *Saccharomyces apiculatus parasiticus*. (*Zent. f. Bakt.* Bd. II. 1, p. 782).
1762. LYONNET. Traité anatomique de la chenille qui ronge le bois de saule. (*La Haye*, 1762).
1866. MENTCHNIKOF (E.). Untersuchungen über die Embryologie der Hemipteren. (*Z. f. wis. Zool.* XVI, p. 128).
1906. a. MERCIER. Un organisme à forme levure parasite de la Blatte (*Periplaneta orientalis*). Levure et Nosema. (*C. R. Soc. Biol.* t. LX, p. 1081).
- 1906 b. — Les corps bactéroïdes de la Blatte. *Bacillus Cuenoti* (n. sp. L. MERCIER). (*C. R. Soc. biol.* t. LXI, p. 682).
1907. MERCIER (L.). Recherches sur les bactéroïdes des Blattides. *Arch. f. Protistenk.* t. IX, p. 346).
1911. — Bactéries des Invertébrés. La glande à concrétions de *Cyclostoma elegans* Drap. (*Bulletin scientifique de la France et de la Belgique*, t. XLIV).
1887. MONIEZ (R.). Sur un champignon parasite de *Lecanium hesperidum* (*Lecaniascus polymorphus nobis*). (*Bull. Soc. Zool. de France*, p. 150).
1909. PIERANTONI DOTT (U.). L'origine di Alcuni organi d'*Icerya purchasi* e la simbiosi ereditaria. (Estratto dal *Bolletino della Società di Naturalisti in Napoli*. (Vol. XXIII. Série 2^a, vol. III).
1910. — Origine e struttura del corpo ovale del *Dactylopius citri* e del corpo verde dell' *Aphis brassicae*. (*Bolletino della Società di Naturalisti in Napoli*. Vol. XXIV, Série 2^a, vol. IV).
1875. PLATEAU (F.). Recherches sur les phénomènes de la digestion chez les insectes. (*Mém. de l'Acad. roy. de Belgique*, t. XLI).
1882. RICHET (CHARLES). Microbes chez les poissons et les animaux marins. (*C. R. Soc. biol.*, p. 669-672).
1883. RICHET (CHARLES) et OLIVIER (LOUIS). Microbes de la lympe des poissons. (*C. R. Ac. Sci.*, t. XCVI, p. 384 et t. XCVII, p. 119 et 674).
1903. RICHET (CHARLES). Les cultures autogènes. (*C. R. Soc. biol.*, p. 1407).
- 1910 a. SULC, Dr KAREL. Pseudovitellus und ähnliche Gewebe der Homopteren sind wohnstätten symbiotischer Saccharomyceten. (*Sitzungsbericht. d. Königl. Bohm. Gesellsch. d. wissen. in Prag.*).
- 1910 b. — Symbiotische saccharomyceten der echten Cicaden (*Cicadidæ*). (*Sitzungsbericht. d. Königl. Böhm. Gesell. d. wissenschaften in Prag.*).
1904. VUILLEMIN (PAUL). Les *Isaria* du genre *Penicillium*. (*Bulletin de la Société mycologique de France*. t. XX, p. 214).
1911. VUILLEMIN (PAUL). Les *Isaria* de la famille des Verticilliacées. (*Bulletin de la Société mycologique de France*. t. XXVII, p. 75).
1863. WEISSMANN (A.). Die Entwicklung der Dipteren im Ei, nach Beobachtungen an *Chironomus Musca vomitoria*. und *Pulex canis*. (*Zeitschr. f. wiss. Zool.* Bd. XIII.).
1889. WHEELER (W. H.). The embryology of *Blatta germanica* and *Doryphora decemlineata*. (*Journ. of Morph.* Boston. vol. III).

SECONDE THÈSE

**Recherches physiologiques sur les insectes
aquatiques.**

Vu et approuvé.

Paris, le 25 Janvier 1911.

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,

PAUL APPELL

Vu et permis d'imprimer :

LE VICE-RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,

L. LIARD

